



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE CLORETO E SULFATO EM
ÁLCOOL ETÍLICO COMBUSTÍVEL UTILIZANDO
ELETROFORESE CAPILAR**

ANDRESSA CAMARGO VALESE

Florianópolis
junho/2010

Andressa Camargo Valese

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
CLORETO E SULFATO EM ÁLCOOL ETÍLICO COMBUSTÍVEL
UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis
06/2010

Andressa Camargo Valese

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
CLORETO E SULFATO EM ÁLCOOL ETÍLICO COMBUSTÍVEL
UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
Orientador

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges

Prof. Dra. Vilma Edite Fonseca Heizen

Florianópolis
Junho/2010

Dedico esta conquista aos
meus pais Valdir e Cleide e ao
meu irmão Guilherme. Amo vocês!

Agradecimentos:

Obrigado primeiramente aos meus pais por todo o apoio, amor incondicional e por sempre confiarem, acreditarem e me apoiarem, mesmo quando nem eu acreditava. Obrigado por sempre estarem perto lembrando que a vida é muito mais. Sem vocês certeza eu não chegaria até aqui.

Ao meu irmão pela amizade, compreensão e amor que nos une.

Aos professores do departamento de Química da UFSC, que ajudaram em minha formação e pela convivência estabelecida e em especial aos que compõem a banca examinadora.

Obrigado a todos os colegas de laboratório, que se tornaram grandes amigos e que sempre me ajudaram, me apoiando, incentivando, ensinando e me fazendo acreditar que este projeto ia dar certo. Um agradecimento especial ao Rafael, que com toda sua paciência sempre me ensinou e me ajudou muito. A Melina, Marcel, Luciano, Mônia e Michelle por todos os dias que me acompanharam até tarde, pelas sugestões, carinho, companheirismo, ensinamentos e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke, por toda a paciência, confiança, dedicação, apoio e principalmente por todo o ensinamento e incentivo dado. A sua contribuição foi muito importante no meu amadurecimento como química e principalmente no meu crescimento pessoal, me fazendo acreditar mais em mim. Obrigada por tudo!

A Ana Carolina pelas sugestões, ensinamentos e ajuda nas correções.

À minha família que sempre unida me apoiou e me ensinou a amar. À minha madrinha Cleusimeri, tia Neide, minha prima Carolina por toda amizade, a minha prima-irmã Aline e aos meus amados afilhados Lorenzo e Lucas.

Aos amigos que fiz neste curso e pretendo levar para toda a vida: Fran, Giovana, Daiane, José Neto, José Antônio e Alfredo. Pelas alegrias vividas, ajudas trocadas, torcidas, risadas, festas, confissões, companheirismo e principalmente por toda a amizade.

E claro aos meus amigos de toda a vida, por tornarem esse caminho muito mais tranquilo pelo simples fato de saber que vocês sempre estiveram ao meu lado: Mariana, Jamila, Akemi, Felipe, Joana, Vanessa, Lúcio, Enzo e Xoxo. Amo muito cada um de vocês.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
LISTA DE EQUAÇÕES	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
1 INTRODUÇÃO	pag 01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	pag 03
2.1 Eletroforese Capilar (EC)	pag 03
2.1.1 Instrumentação	pag 04
2.1.2 Fluxo Eletrosmótico	pag 05
2.1.3 Introdução da Amostra	pag 06
2.1.4 Detecção da Amostra	pag 07
2.2 Análise de íons inorgânicos em álcool combustível por diferentes métodos	pag 08
2.2.1 Análise de íons inorgânicos em álcool combustível por eletroforese capilar	pag 09
3 OBJETIVOS.....	pag 11
3.1 Objetivos gerais	pag 11
3.2 Objetivos específicos.....	pag 11
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	pag 12
4.1 Preparo das amostras.....	pag 12
4.2 Amostras de Álcool Combustível.....	pag 12
4.3 Preparo das Amostras.....	pag 12
4.4 Equipamentos	pag 13
4.5 Condicionamento do capilar e parâmetros instrumentais	pag 13
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	pag 14
5.1 Desenvolvimento do método	pag 14
5.2 Escolha do Padrão Interno	pag 18
5.3 Preparo da Amostra	pag 18
5.4 Figuras de mérito	pag 19
5.5 Determinações de cloreto e sulfato a partir da curva de calibração interna universal	pag 23
5.6 Comparação entre curvas de Calibração Externa com a Calibração Interna Universal	pag 24

5.7 Aplicações do método	pag 25
6 CONCLUSÕES.....	pag 27
6.1 Perspectivas	pag 27
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pag 28

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA1 – Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar	pag 04
FIGURA 2 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico	pag 05
FIGURA 3 – Representação esquemática do modo de operação – detecção indireta	pag 08
FIGURA 4 – Parâmetros Eletroforéticos utilizando o “software” Peakmaster	pag 14
FIGURA 5 – Efeito da concentração de Hexa-OH na velocidade de migração dos analitos	pag 16
FIGURA 6 - Representação esquemática dos modos de separações de ânions por eletroforese capilar. A. Polaridade da fonte de alta tensão normal. B. Polaridade da fonte de alta tensão invertida	pag 17
FIGURA 7 – Eletroferograma de padrões de cloreto e sulfato	pag 17
FIGURA 8 – Gráfico de correlação entre a percentagem de etanol <i>versus</i> a razão da área do analito pelo padrão interno	pag 18
Figura 9 - Resultado da curva de calibração externa para os ânions cloreto e sulfato. A. Curva de calibração externa para o cloreto B. Curva de calibração externa para o sulfato	pag 19
Figura 10 – Comparações entre a curva de calibração externa e calibração interna para adições de padrão de cloreto	pag 24
Figura 11 – Comparações entre a curva de calibração externa e calibração interna para adições de padrão de sulfato	pag 25
FIGURA 12 – Eletroferograma das amostras de combustíveis	pag 26

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Concentrações limites estabelecidas pela ANP para íons em álcool etílico combustível hidratado e álcool etílico anidro	pag 02
TABELA 2 – Parâmetros da curva de calibração	pag 20
TABELA 3 – Ensaio de recuperação para o ânion cloreto.....	pag 21
TABELA 4 – Ensaio de recuperação para o ânion sulfato	pag 21
TABELA 5 – Figuras de mérito do método proposto para o ânion cloreto	pag 22
TABELA 6 – Figuras de mérito do método proposto para o ânion sulfato	pag 23
TABELA 7 – Efeito da mobilidade eletroforética, valores de TR_{IUS}/TR_x	pag 24
TABELA 8 – Quantificação para os ânions cloreto e sulfato nas amostras de combustíveis	pag 25

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – Cálculo da quantidade da amostra injetada	pag 06
EQUAÇÃO 2 – Cálculo da concentração do analito através da taxa de transferência	pag 07
EQUAÇÃO 3 – Cálculo da concentração do analito	pag 07

LISTA DE ABREVIATURAS

OPEP – Organização dos Países Exportadores de Petróleo
 PRÓ-ÁLCOOL – Programa Nacional do Alcool
 AEAC – Alcool Etílico Anidro Combustível
 AEHC – Alcool Etílico Hidratado Combustível
 ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
 CE – Eletroforese Capilar
 ECZ – Eletroforese Capilar de Zona
 ECSL – Eletroforese Capilar em Solução Livre
 FEO – Fluxo Eletrosmótico
 n_x – Quantidade injetada do analito
 D.I. – Diâmetro interno do capilar
 μ_{EOF} – Mobilidade do fluxo eletrosmótico
 μ_x – Mobilidade eletroforética do analito
 U_{inj} – Voltagem da injeção
 L – Comprimento do capilar
 t_{inj} – Tempo de injeção
 c_x – Concentração do analito
 k_{BGE} – Condutividade do co-íon
 k_s – Condutividade do eletrólito de corrida
 c_{IUS} – Concentração do padrão interno
 A_x – Área do analito
 A_{IUS} – Área do padrão interno
 TR_{IUS} - Taxa de transferência das mobilidades do padrão interno
 TR_x - Taxa de transferência das mobilidades do analito.
 $n_{x,B}$ – Valência do íon
 EMD – Dispersão por eletromigração
 PI – Padrão interno
 HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
 LOD – Limite de detecção
 LOQ – Limite de quantificação
 R^2 - coeficiente de determinação
 μ_{eff} – Mobilidade efetiva

μ_B – Mobilidade do co-íon

μ_{count} – Mobilidade do contra-íon

μ_{IUS} – Mobilidade do padrão interno

RESUMO

O álcool etílico combustível pode ser produzido através de diversas matérias-primas, como milho, trigo, beterraba e cana-de-açúcar. No Brasil este combustível é produzido a partir da cana-de-açúcar utilizado para a bioconversão em etanol. O álcool etílico combustível pode ser utilizado na sua forma anidra, adicionada à gasolina numa proporção de 20 a 25% (v/v) que age como anti-detonante, substituindo os compostos organometálicos que antes eram utilizados na gasolina e continham chumbo ou manganês. Ainda pode ser usado na forma hidratada, na proporção de 95% de etanol (v/v), utilizado diretamente como combustível automotivo. Este trabalho teve como objetivo a determinação dos ânions cloreto e sulfato em amostras de álcool etílico combustível utilizando eletroforese capilar com detecção indireta. A quantificação foi realizada através de curvas calibração interna universal comparativamente com curvas de calibração externa para os analitos. O método foi aplicado a seis amostras de álcool etílico combustível adquirido em diferentes postos de combustíveis da grande Florianópolis. Foi utilizada injeção eletrocinética e o preparo da amostra se deu através da diluição na proporção de 1:1 (v/v) com padrão interno perclorato. As curvas de calibração para os dois analitos apresentaram coeficientes de determinação maiores que 0,99. O método demonstrou linearidade e repetibilidade satisfatórias, o que evidencia a aplicabilidade e facilidade da utilização da eletroforese capilar na determinação destes analitos em amostras de álcool etílico combustível. Todas as amostras apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela ANP, de 1 mg L^{-1} e 4 mg L^{-1} para cloreto e sulfato, respectivamente.

Palavras-chave: álcool combustível, íons cloreto e sulfato, injeção eletrocinética e eletroforese capilar.

Introdução e Justificativa

O álcool etílico combustível pode ser produzido através de diversas matérias-primas, tais como milho, trigo, beterraba e cana-de-açúcar. No Brasil e na maior parte dos países tropicais, este combustível é produzido a partir da cana-de-açúcar utilizada para a bioconversão em etanol, uma vez que apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo de lignina, além de ter um baixo custo de colheita, transporte e armazenamento [1].

A utilização do álcool como combustível no Brasil iniciou-se a partir da década de 30, e o consumo expressivo se deu a partir da crise do petróleo (principal fonte energética mundial), onde a instabilidade política no Oriente Médio (maior região produtora de petróleo) criou uma série de conflitos que resultaram na criação da OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) que passou a impor preços e controlar a produção [2]. Esta política atingiu diretamente o Brasil, onde em um único ano, de 1973 a 1974, as despesas com a importação de petróleo aumentaram de US\$ 600 milhões para US\$ 2,5 bilhões [3].

O governo de Ernesto Geisel criou, portanto, o Programa Nacional do Álcool, o PROÁLCOL, em 14 de novembro de 1975, com o objetivo de reduzir a importação do petróleo, estimulando a pesquisa e a produção de novas fontes alternativas para a substituição de combustíveis derivados do petróleo. Este programa gerou incentivos para a modernização e construção de novas usinas de álcool e também incentivos fiscais que reduziram os impostos para a compra de veículos movidos a etanol. [4]

O álcool etílico combustível pode ser utilizado na sua forma anidra (AEAC), adicionada à gasolina numa proporção de 20 a 25% (v/v) que age como anti-detonante, substituindo os compostos organometálicos que antes eram utilizados na gasolina e continham chumbo ou manganês [5]. Este combustível também pode ser utilizado na forma hidratada (AEHC, 92,6% v/v de etanol), usado diretamente como combustível automotivo. [6]

O álcool etílico é um excelente combustível automotivo, por apresentar um índice de octanagem maior que a gasolina e ter uma pressão de vapor inferior, resultando em menos emissões evaporativas [7]. A utilização deste combustível tem como vantagens ambientais a redução das emissões de SO₂, CO, hidrocarbonetos e principalmente a redução de gases de efeito estufa, uma vez que o processo de

fotossíntese da cana de açúcar absorve um volume equivalente de CO_2 da queima do álcool e do bagaço. O CO_2 gerado na combustão é absorvido da atmosfera pelas plantas durante a fotossíntese [3].

Diversos são os parâmetros de qualidade que devem ser avaliados a fim de se atestar a qualidade do etanol comercializado pelas inúmeras destilarias do país, conforme mostra a Tabela 1[6]:

Tabela 1: Concentrações limites estabelecidas pela ANP para íons em AEHC e AEAC

Característica	Unidades	AEHC	AEAC
Acidez total (ex. ácido acético), máx.	mg/L	30	30
Teor de etanol, mín.	% vol.	92,6	99,3
Massa específica a 20°C, máx.	kg/m ³	807,6 a 811,0	791,5
Cloreto, máx.	mg/L	1	-
Sulfato, máx.	mg/L	4	-
Sódio, máx.	mg/L	2	-
Ferro, máx.	mg/L	5	-
Cobre, máx.	mg/L	-	0,07

Neste trabalho o enfoque será dado para a determinação dos íons inorgânicos cloreto e sulfato. A presença destes ânions em altas concentrações acarreta em problemas de corrosão do tanque combustível, sistema de injeção e motor do automóvel, o que resulta na deterioração destes materiais pela ação química ou eletroquímica do meio, diminuindo a vida útil dos mesmos. [8]

Os métodos clássicos para a determinação de ânions inorgânicos são os calorimétricos, cromatográficos e por via úmida. A proposta deste trabalho é desenvolver uma metodologia analítica utilizando eletroforese capilar como técnica analítica, a fim de reduzir custos operacionais, tempo de análise e geração de resíduos, o que é muito importante do ponto de vista econômico e ambiental.

2. Revisão da Literatura:

2.1 Eletroforese Capilar:

A eletroforese é uma técnica instrumental de separação, baseada nas velocidades de migração de espécies diferentemente carregadas com a aplicação de um campo elétrico [9]. As partículas migram para o ânodo ou cátodo em função da sua carga específica e a separação está baseada na diferença entre as mobilidades iônicas, que estão relacionadas com a razão carga/massa, e com fatores estruturais.

Desenvolvida pelo químico sueco Arne Tiselius no início da década de 30, a eletroforese foi usada para o estudo de proteínas no soro sanguíneo, rendendo ao químico o prêmio Nobel no ano de 1948. [10]

Em seu formato capilar, a eletroforese foi desenvolvida nos anos 70. O desenvolvimento da técnica gerou interesse na indústria de biotecnologia, no que diz respeito ao seqüenciamento do DNA para o projeto Genoma Humano, além de ser uma técnica que se aplica para separações de cátions e ânions inorgânicos, aminoácidos, drogas, vitaminas, carboidratos, peptídeos, ácidos nucleicos, entre outros. [11]

Atualmente, o termo eletroforese tem sido utilizado para nomear todos os tipos de técnicas de separação eletrodirigidas [12].

A eletroforese capilar (CE) é realizada em tubos capilares (com dimensões de 15-100 µm de diâmetro interno). A CE oferece vantagens em relação a outros métodos de eletroforese devido ao formato geométrico do capilar (a área superficial interna é grande comparada ao volume total) que dissipa o calor gerado pela passagem de corrente, controlando o efeito Joule de forma eficiente. Com isto é possível a aplicação de elevados valores de campo elétrico, resultando em separações de alta eficiência. Esta técnica oferece muitas vantagens, tais como o baixo consumo de amostras, reagentes e solventes, além da compatibilidade com vários detectores, entre eles o de absorção no UV-VIS e de espectrometria de massas [13], que fazem da CE uma técnica muito versátil.

Diversos são os modos de operação da eletroforese capilar. Neste trabalho será utilizada a eletroforese capilar de zona (ECZ), também conhecida como eletroforese capilar em solução livre (ECSL).

A eletroforese capilar de zona é uma técnica de fronteira móvel, onde a amostra é introduzida em um tubo capilar na presença de uma solução tampão e é aplicada uma diferença de potencial. Após a geração do campo elétrico, os componentes da amostra migram com diferentes velocidades, de acordo com sua própria mobilidade. [13]

2.1.1. Instrumentação:

Uma das características importantes da EC é a simplicidade instrumental. O sistema consiste basicamente de: eletrodos (normalmente de platina); um sistema de detecção; capilar (usualmente de sílica fundida); uma fonte de alta tensão para o estabelecimento de um campo elétrico ao longo do capilar, que pode funcionar com tensão constante (-30 a 30 kV) ou com corrente constante (-200 a 200 μ A). Uma representação esquemática da instrumentação utilizada em EC é ilustrado na Figura 1.

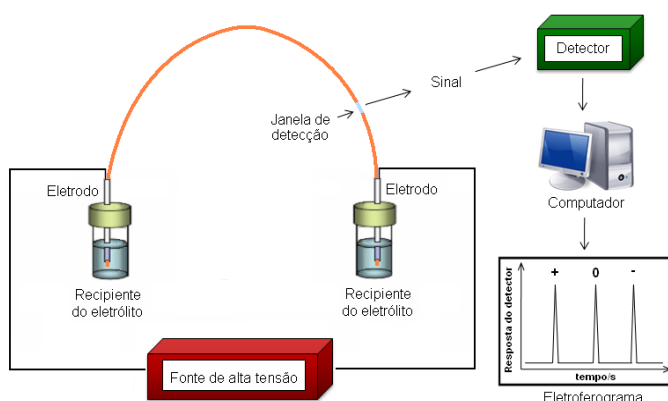


Figura 1. Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar

2.1.2. Fluxo eletrosmótico

Capilares de sílica fundida são muito usados em eletroforese capilar por apresentarem boa condutividade térmica e transparência na região do UV-Vis. Um fator extremamente importante na separação por EC é o fluxo eletrosmótico (FEO), o qual ocorre pela presença de grupos silanóis presentes na parede interna do capilar. Estes grupos apresentam caráter ácido, e em contato com soluções aquosas com pH acima

de 3,0 tornam-se ionizados, fazendo com que a parede do capilar apresente carga negativa. [14]

Estes grupos ionizados atraem os prótons H^+ oriundos da solução de corrida, formando uma camada de cátions próxima da parede do capilar (camada fixa). Esta camada não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas existentes na parede, então é formada uma segunda camada de cátions (camada móvel). Um potencial é aplicado e a camada móvel, junto com as moléculas de água que solvatam estes íons, migram para o cátodo, gerando um fluxo denominado fluxo eletrosmótico, como mostrado na Figura 2:

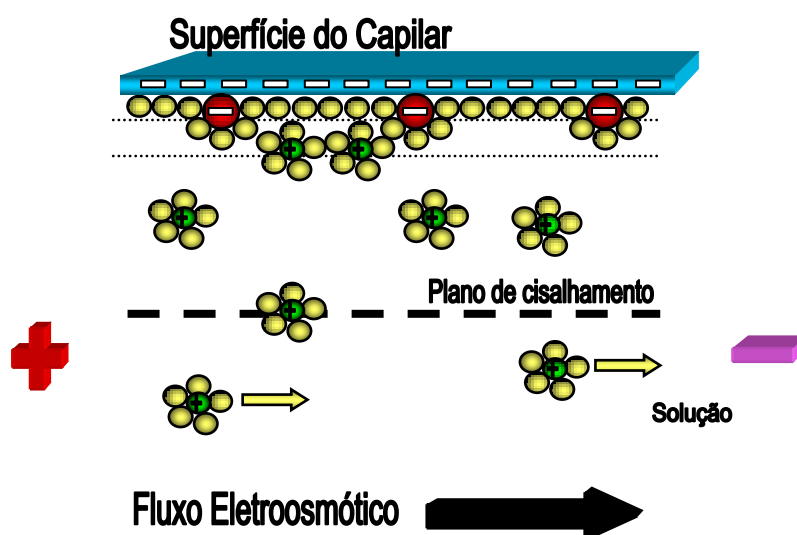


Figura 2: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.

Este fluxo pode ser o responsável pelo transporte das espécies presentes na amostra até o detector. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para controlar o fluxo eletrosmótico, dentre as mais utilizadas destacam-se, o controle do pH, a variação da concentração da solução tampão, adição de agentes tensoativos, entre outras.

Em EC, existem dois modos de análise: o co-eletrosmótico e o contra-eletrosmótico. No primeiro caso, os analitos migram na mesma direção do fluxo eletrosmótico, como por exemplo, na análise de cátions. Já no modo contra-eletrosmótico, os analitos migram no sentido contrário ao fluxo eletrosmótico, que é o responsável por carregá-los até o detector, utilizado, por exemplo, na análise de ânions. [15]

2.1.3. Introdução da amostra:

Em EC as amostras podem ser introduzidas por injeção hidrodinâmica ou eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é realizada pela diferença de pressão que se estabelece entre o reservatório do eletrólito de corrida e o capilar. O volume da amostra injetada depende do tamanho do capilar, viscosidade da amostra e diferença de pressão utilizada.

Na injeção eletrocinética, um potencial é aplicado durante um determinado intervalo de tempo. A quantidade de amostra introduzida no capilar depende da mobilidade eletroforética dos componentes analisados, do fluxo eletrosmótico e da condutividade do meio. A quantidade injetada pode ser calculada através da Equação 1:

$$n_x = \frac{1}{4} \pi d^2 \left(\mu_{EOF} \pm \frac{k_{BGE}}{k_s} \mu_x \right) \frac{U_{inj}}{L} t_{inj} C_x \quad (1)$$

onde d é o diâmetro interno do capilar, μ_{EOF} é a mobilidade do fluxo eletrosmótico, μ_x é mobilidade do analito, U_{inj} , a voltagem utilizada durante a injeção, L refere-se ao comprimento total do capilar, t_{inj} , o tempo de injeção, C_x é a concentração do analito, t_{inj} diz respeito ao tempo de injeção, k_{BGE} e k_s a condutividade do eletrólito e da solução do analito, respectivamente.

A injeção eletrocinética apresenta algumas dificuldades no momento da quantificação, pois a quantidade injetada de um determinado soluto depende da condutividade da amostra. Deste modo, quando soluções de padrão apresentam diferenças de condutividade em relação à amostra ou as amostras diferem entre si, a quantidade de analito injetada pode ser diferente. Mas apesar desta dificuldade, a sua aplicação é muito simples e pode alcançar alta sensibilidade.

A fim de minimizar estes erros inerentes ao uso da injeção eletrocinética, Gaspar *et al.* aplicaram a calibração interna universal para compostos totalmente dissociados [16], utilizando um eletrólito de corrida e padrão interno com mobilidade similar à dos íons analisados. A partir do método proposto foi possível quantificar os diferentes componentes da amostra com apenas uma única injeção. Este procedimento permitiu

calcular facilmente a concentração dos analitos com um desvio padrão relativo menor que 5%. A fundamentação do procedimento pode ser descrita pelas Equações 2 e 3.

A concentração do íon na amostra pode ser calculada utilizando a Equação 2:

$$C_x = C_{IUS} \frac{A_x}{A_{IUS}} \frac{TR_{IUS}}{TR_x} n_{x,B} \quad (2)$$

sendo, C_{IUS} a concentração do padrão interno universal, A_x , área do analito, A_{IUS} está relacionado a área do padrão interno universal, TR_{IUS} , a taxa de transferência das mobilidades do padrão interno e TR_x é a taxa de transferência das mobilidades do analito.

O valor de TR_{IUS}/TR_x depende da mobilidade de todos os íons envolvidos. Este valor aproxima-se de 1, quando as mobilidades do co-íon e o contra-íon são muito semelhantes.

Logo a Equação 2, pode ser resumida através da Equação 3, onde o valor de $n_{x,B}$ é a razão entre as valências do analito e do co-íon.

$$c_x = C_{IUS} \frac{A_x}{A_{IUS}} n_{x,B} \quad (3)$$

Sendo assim, conhecendo-se o valor da concentração do padrão interno (C_{IUS}), as áreas do analito (A_x) e do padrão interno (A_{IUS}) e a valência do íon $n_{x,B}$ é possível determinar a concentração do analito.

2.1.4. Detecção da Amostra

A detecção indireta é mais utilizada para amostras de ânions inorgânicos, pois a maioria destes íons não apresenta absorção na região do UV-Vis [17]. Portanto, a detecção indireta é possível quando um eletrólito de corrida contém como co-íon (componente do eletrólito de corrida com a mesma carga do analito), uma substância cromófora. O deslocamento do cromóforo pela amostra leva a uma diminuição transiente do sinal do eletrólito durante a passagem deste pelo detector, ou seja, os

componentes que não absorvem serão detectados como picos negativos, como ilustrado esquematicamente na Figura 3.

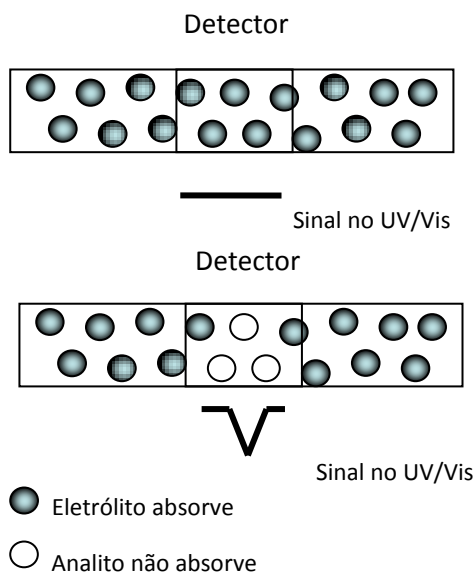


Figura 3. Representação esquemática do modo de detecção indireta

2.2. Análise de íons inorgânicos em álcool combustível utilizando diferentes métodos:

Os íons cloreto e sulfato estão presentes em amostras de álcool combustível, mas apenas no álcool etílico hidratado. A ANP recomenda três métodos para determinação destes íons: (i) NBR10894, que determina cloretos e sulfatos utilizando cromatografia iônica; (ii) NBR10895, que determina o teor de íon cloreto por volumetria; (ii) NBR12120, que determina o teor de sulfatos por volumetria. [6]

Na literatura são apresentados vários métodos para determinação destes íons em amostras de álcool combustível, todos objetivando rapidez, baixo custo e resultados satisfatórios.

Barbeira et al. descreveram um método para a determinação de cloreto empregando titulação potenciométrica em álcool hidratado combustível. Os autores utilizaram um eletrodo indicador de fio de prata e um de referência de Ag/AgCl, KCl_(Sat). Na determinação foram utilizados 100 mL da amostra, 1 mL de HNO₃ 0,01 mol L⁻¹, através de titulação com uma solução de nitrato de prata 0,0005 mol L⁻¹ em água desionizada, o que proporcionou curvas de titulação potenciométricas bem definidas e reproduzíveis. [8]

Teixeira et *al.* propuseram um método utilizando espectrometria de fluorescência de raios-X de energia dispersa para determinação de íons cloreto e sulfato após o procedimento de precipitação em álcool combustível, utilizando cloreto de prata e sulfato de bário, seguida por filtração. Os elementos foram determinados sobre o papel de filtro usando a prata e bário para a determinação indireta. [18]

Oliveira et *al.* desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de íons sulfato em amostras de álcool combustível baseado na reação com bário-dimetilsulfonazo(III) [Ba-DMSA(III)] que leva a um decréscimo da magnitude do sinal analítico monitorado em 665 nm. Um pré-tratamento para a remoção de álcool foi realizado por combustão para evitar efeitos da matriz na determinação de sulfatos. A otimização da análise foi realizada pelo método Box-Behnken e foi utilizado um processo de injeção seqüencial. [19]

2.2.1 Análise de íons inorgânicos em álcool combustível por eletroforese capilar:

Na literatura foram encontrados dois métodos diferentes para determinação de íons inorgânicos em álcool combustível.

Munoz et *al.* propuseram um método novo e versátil para análise rápida de íons em etanol utilizando eletroforese capilar para a quantificação de cátions (sódio, potássio, cálcio, magnésio e amônio) e ânions (sulfato, cloreto e nitrato). A injeção direta da amostra no capilar apresentou falta de repetibilidade, portanto as amostras foram preparadas coletando alíquotas de 1 mL de álcool combustível, evaporando a mesma a 90°C em uma chapa de aquecimento. Sendo acrescentada posteriormente a mesma quantidade de água desionizada seguida pela resuspensão do material residual, levando a resultados confiáveis. O eletrólito utilizado foi 20 mmol L⁻¹ de ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico (MES), 20 mmol L⁻¹ de L-Histidina (HIS) e 0,2 mmol L⁻¹ de hidróxido de cetiltrimetilamônio (CTOH). O padrão interno foi o lactato. O tempo de análise foi de 5 minutos, utilizando injeção hidrodinâmica. [20]

Pereira et *al.* relataram a análise de contaminantes orgânicos e inorgânicos em amostras de álcool combustível. Foram coletadas alíquotas de 5 mL de etanol combustível e as amostras foram evaporadas (60°C sob fluxo de nitrogênio). O resíduo foi dissolvido em 500 µL de água desionizada e os íons cloreto e sulfato foram

analizados com o eletrólito constituído por 10 mmol L⁻¹ de ácido monocloroacético e 10 mmol L⁻¹ de nitrato de sódio, pH 2,0, com detecção indireta em 210 nm, utilizando injeção hidrodinâmica, sendo o tempo de análise de quatro minutos. [21]

3. Objetivos:

3.1. Objetivos Gerais:

Desenvolvimento de um método utilizando eletroforese capilar para a separação e determinação de cloreto e sulfato em amostras de álcool etílico hidratado combustível.

3.2. Objetivos Específicos:

- Otimização da composição do eletrólito de corrida utilizando “software” de simulação em eletroforese capilar;
- Escolha do padrão interno;
- Quantificação dos analitos nas amostras para verificação se as mesmas se enquadram nos limites de qualidade estabelecidos pela ANP;
- Validação da metodologia proposta com relação à seletividade, linearidade, precisão inter e intra-ensaio e exatidão;
- Aplicação da metodologia proposta em amostras adquiridas em diferentes postos de combustíveis locais.

4. Procedimento Experimental:

4.1 Preparo das soluções:

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada (desionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, E.U.A). Para o preparo das soluções foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto de sódio (NaCl) e etanol grau HPLC obtido da Merck (Rio de Janeiro, RJ); sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) obtido da F. Maia (São Paulo, SP); perclorato de sódio (NaClO₄) obtido da Riedel de Haen (São Paulo, SP); tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS) obtido da Fluka (São Paulo, SP); ácido nítrico (HNO₃) obtido da Nuclear (São Paulo, SP); nitrato de potássio (KNO₃) obtido da Synth (São Paulo, SP); e hidróxido de hexametônio (Hexa-OH) adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP).

Soluções estoques dos padrões dos ânions cloreto e sulfato foram preparadas separadamente cada uma na concentração de 100 mg L⁻¹. A solução de padrão interno, perclorato, foi preparada separadamente dos ânions na concentração de 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ e diluída até a concentração desejada. Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração a 4°C.

O eletrólito de corrida foi constituído de 10 mmol L⁻¹ de HNO₃, 20 mmol L⁻¹ de TRIS e 1 mmol L⁻¹ de HEXA-OH em meio aquoso, preparado sempre no momento das análises.

4.2 Amostras de Álcool Combustível:

As amostras foram coletadas em seis postos de combustíveis distintos da grande Florianópolis.

4.3 Preparo das Amostras:

As amostras de álcool etílico combustível receberam um pré-tratamento simples, que consiste na diluição de 1:1 (v/v) da amostra com o padrão interno perclorato de sódio na concentração de 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹.

4.4 Equipamentos:

O equipamento de eletroforese capilar utilizado para as análises foi o P/ACE_{TM}MDQ (Beckman Coulter), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas foram realizadas a 25°C em um capilar de sílica fundida revestido com poliimida (Polymicro Technologies, E.U.A.) de dimensões de 30,2 cm de comprimento total e 20,2 cm de comprimento até o detector, com 50 µm D.I..

4.5 Condicionamento do capilar e parâmetros instrumentais:

O primeiro condicionamento do capilar foi feito a 25°C através da passagem de uma solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ durante uma hora, seguida de água desionizada durante uma hora e solução de eletrólito por mais uma hora. Em virtude de o capilar ser novo ele recebeu este condicionamento inicial. O condicionamento diário foi realizado pela passagem de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ durante 15 minutos, seguida de água desionizada por mais 15 minutos e por último eletrólito durante 15 minutos.

Todas as soluções foram introduzidas pelo “inlet” (extremidade do capilar mais distante do detector) com injeção eletrocinética de 8 kV por 10 s. A separação dos analitos foi efetuada sob aplicação de uma tensão de 30 kV com polaridade negativa e detecção por UV-Vis com monitoramento em 214 nm.

Todos os dados obtidos foram tratados em planilhas eletrônicas do Microsoft Excel 2007.

5. Resultados e Discussão:

5.1 Desenvolvimento do método:

Por não absorverem luz na região do UV-Vis a separação e a identificação de cloreto e sulfato por eletroforese capilar é conduzida por soluções aquosas que contêm um íon cromóforo na solução de eletrólito. Este co-íon deve apresentar uma mobilidade muito próxima dos analitos estudados assim como o padrão interno, que também deve conter esta mesma propriedade.

As curvas de mobilidade dos analitos auxiliam na escolha do pH da separação, no modo de operação e os componentes do eletrólito de corrida, portanto o desenvolvimento do método foi realizado utilizando o “software” Peakmaster 5.1 para a simulação dos valores da mobilidade eletroforética dos analitos *versus* pH a partir de diversos ânions, com isso foi possível escolher os componentes do eletrólito de corrida. Após a escolha dos componentes do eletrólito de corrida (TRIS e nitrato), foram construídas curvas (Figura 4) para avaliação do comportamento de cada ânion quanto aos parâmetros de: mobilidade efetiva, EMD e condutividade. Todas as simulações foram feitas variando a concentração do cátion TRIS de 9 mmol L⁻¹ até 22 mmol L⁻¹, conseqüentemente o valor do pH variou. O nitrato foi mantido constante na concentração de 10 mmol L⁻¹.

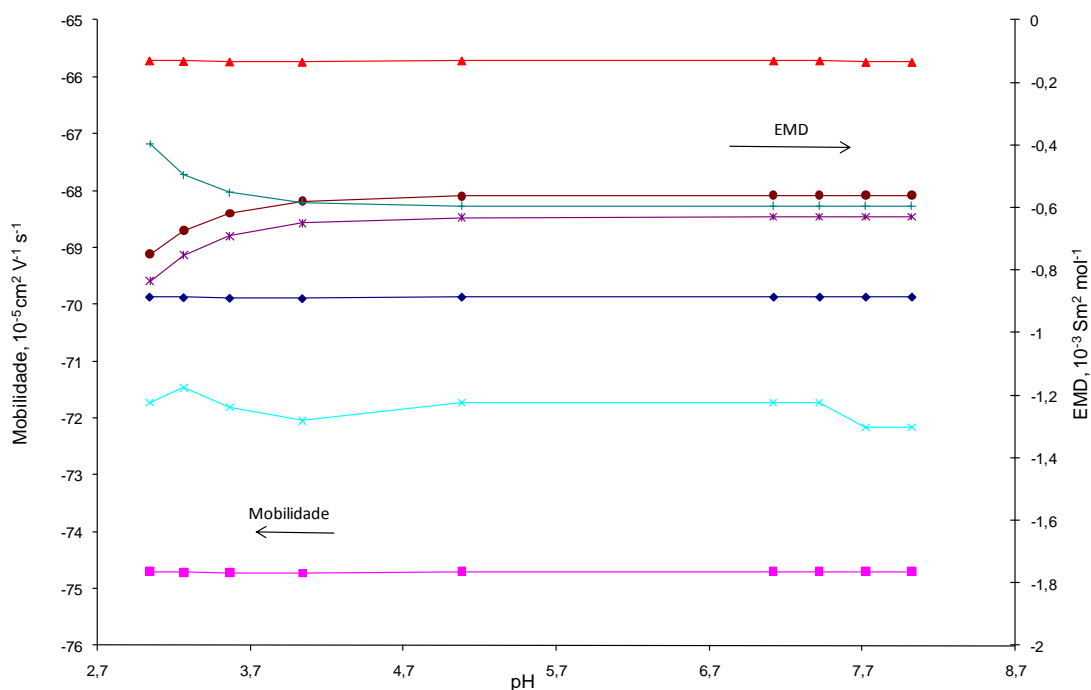


Figura 4: Parâmetros eletroforéticos utilizando o “software” Peakmaster 5.1. Concentração de nitrato 10 mmol L⁻¹, TRIS 9 – 22 mmol L⁻¹. Legenda: Mobilidade (▲ perclorato; ◆ nitrato ; × sulfato; ■ cloreto). EMD (+ sulfato; ● perclorato e * cloreto).

O nitrato foi escolhido como co-íon para compor o eletrólito de corrida uma vez que este ânion possui uma alta absorção na região do UV-Vis, alta estabilidade em solução e principalmente por ter uma mobilidade eletroforética muito próxima dos ânions analisados, mas por não possuir capacidade tamponante, usou-se o cátion TRIS para tamponar o meio. Por ser um padrão primário é fácil de pesar e preparar em solução.

De acordo com a Figura 4, o pH de trabalho escolhido foi acima de 7,7 por apresentar valor de EMD mais próximo a zero, devido a mobilidade dos analitos serem constante nesta faixa de pH e, principalmente pelo valor de pKa do TRIS, 8,01.

A dispersão por eletromigração (EMD) se deve a diferença de intensidade do campo elétrico entre a zona do analito e do eletrólito de corrida. Esta deve ser próxima a zero, o que caracteriza picos simétricos. Para os analitos estudados, o valor de EMD encontra-se próximo a $-0,6 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Por trabalharmos em valores de pH alto, o que resulta em um fluxo eletrosmótico elevado, e visto que a análise é realizada no modo contra-eletrosmótico, usamos o Hexa-OH, que é um complexante da parede interna do capilar, o que reduz a quantidade de carga negativa disponível na parede interna do capilar o que leva a um decréscimo do fluxo eletrosmótico. Diversas concentrações deste complexante foram testadas conforme mostra a Figura 5:

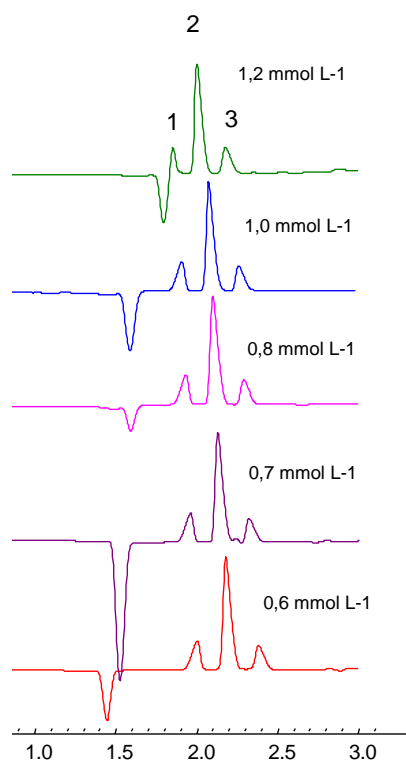


Figura 5. Efeito da concentração de Hexa-OH na velocidade de migração dos analitos. Legenda: 1. cloreto 2. sulfato 3. perclorato. Eletrólito constituído por 10 mmol L⁻¹ HNO₃, 20 mmol L⁻¹ TRIS, pH=8,13. Parâmetros instrumentais: injeção eletrocínica (8 kV, 10 s); tensão aplicada – 30 kV; pH 8,13; temperatura 25°C; detecção indireta em 214 nm.

A concentração definida do complexante foi de 1 mmol L⁻¹ onde se observa que a velocidade dos analitos é mais rápida, devido ao fato de que o FEO está mais lento.

De acordo com todas as condições discutidas, a composição do eletrólito de corrida otimizado foi de 10 mmol L⁻¹ de HNO₃, 20 mmol L⁻¹ de TRIS e 1 mmol L⁻¹ de Hexa-OH, pH de 8,13 com uma capacidade tamponante superior a 10 mmol L⁻¹.

Uma vez que os íons cloreto e sulfato possuem uma mobilidade alta, a polaridade da fonte de alta tensão foi invertida para que o detector fique mais próximo ao ânodo (Figura 6. B). Desta forma, mesmo os analitos migrando em sentido contrário ao do fluxo, por eles apresentarem uma mobilidade eletroforética maior que a do fluxo, eles conseguem alcançar o detector. Isto não acontecia com a polaridade normal (Figura 6. A), já que os íons não conseguiam chegar até o detector por serem muito rápidos e acabavam retornando ao ânodo.

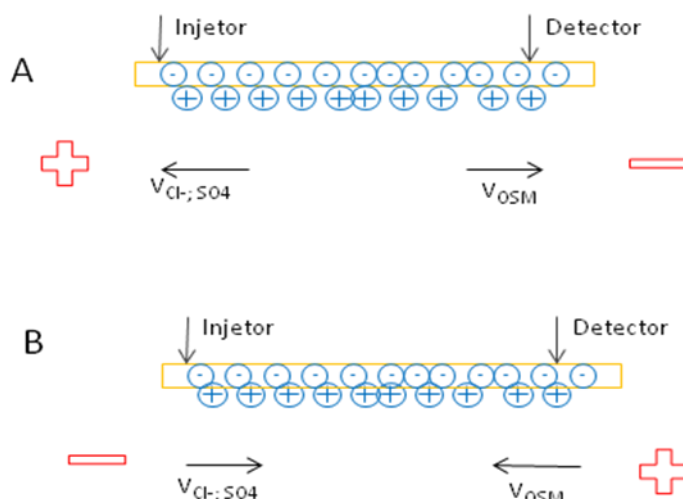


Figura 6. Representação esquemática dos modos de separações de ânions por eletroforese capilar. **A.** Polaridade da fonte de alta tensão normal. **B.** Polaridade da fonte de alta tensão invertida.

O comprimento de onda utilizado para fazer a detecção indireta dos ânions inorgânicos foi em 214 nm, já que o nitrato absorve neste comprimento de onda.

A tensão definida para a separação dos ânions foi de - 30 kV, em que se observa uma velocidade maior, sem comprometimento da separação e eficiência dos picos. A Figura 7 mostra um eletroferograma da separação dos ânions com o eletrólito otimizado.

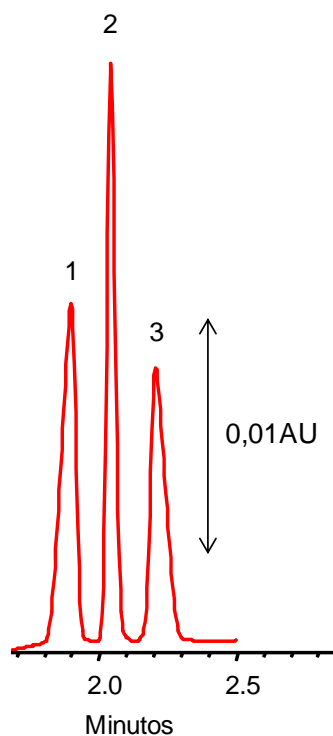


Figura 7: Eletroferograma de padrões de cloreto e sulfato na concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Legenda: 1. Cloreto; 2. Perclorato (PI); 3. Sulfato. Eletrólito constituído por $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ TRIS}$ e 1

mmol L⁻¹ Hexa-OH; pH 8,13. Parâmetros instrumentais: injeção eletrocinética (8 kV, 10 s); tensão aplicada - 30 kV; 25°C; detecção indireta em 214 nm.

5.2 Escolha do Padrão Interno:

Para corrigir erros referentes à injeção eletrocinética, optou-se por utilizar um padrão interno, o perclorato, em uma concentração próxima ao limite do cloreto (1 mg L⁻¹) estabelecido pela ANP. Portanto a concentração final foi otimizada em $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Foi escolhido este PI por ele possuir uma mobilidade próxima ao do cloreto e sulfato (Figura 4).

5.3 Preparo da Amostra:

Com o intuito de determinar qual a melhor quantidade em porcentagem de etanol que a razão de valências entre a área do sulfato pelo padrão interno permanecesse próximo a dois e a do cloreto e perclorato próxima a um, construiu-se um gráfico da razão analito/PI com diferentes proporções de etanol, Figura 8.

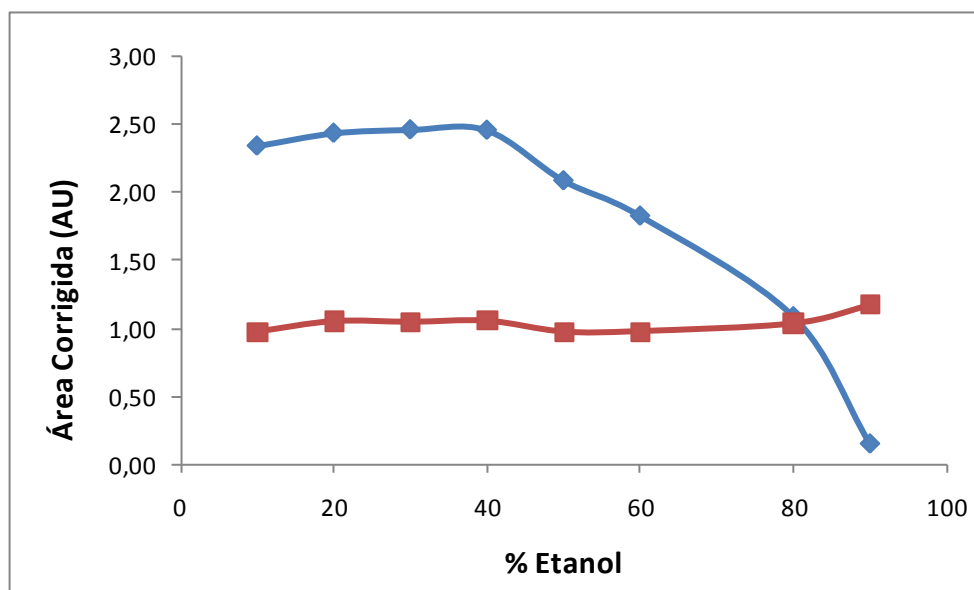


Figura 8: Gráfico de correlação entre a % etanol *versus* a razão do analito pelo padrão interno. Legenda: ■ Cloreto e ◆ Sulfato.

Estes dois íons apresentam mobilidade menor em soluções com solvente orgânico devido ao aumento da viscosidade e diminuição da constante dielétrica. O raio solvatado dos íons também é afetado, devido às mudanças no comportamento de solvatação do meio. É difícil de medir estes parâmetros e existem poucas sugestões na

literatura, um deles é o modelo sugerido por Lucy e colaboradores, onde foi mostrado que a fração dielétrica pode ser um fator importante que afeta na mobilidade dos íons em meio não aquoso e, portanto sugeriram que o modelo de Hubbard-Onsager (HO) que trata das interações íon-solvente como uma perturbação da dinâmica da orientação do solvente é causada pela carga do íon e tamanho, então a mobilidade dos ânions carregados duplamente diminui a mobilidade mais significativamente do que os de uma carga. [23 – 25]

Esta teoria entra de acordo com a Figura 8, onde a queda da mobilidade começa a ser mais aparente para o sulfato a partir de 40% de etanol devido à diminuição da sua mobilidade que leva a uma menor injeção do analito. Este fenômeno não acontece de forma tão drástica para o cloreto, pois ele não sofre tanta alteração na mobilidade por ser um íon monovalente.

A razão de valências esperada é mantida até a concentração de 60% de etanol, portanto escolheu-se fazer a diluição da amostra de combustível em 50% v/v pela facilidade de preparo da amostra.

5.4 Figuras de mérito:

Para uma determinação quantitativa das amostras e verificar a validade do método, primeiramente foi construída uma curva de calibração externa dos padrões cloreto e sulfato. Tanto o cloreto quanto o sulfato foram preparados em água na concentração de 10 mg L^{-1} cada, e depois misturados formando apenas uma solução de 5 mg L^{-1} que foi estocada. A partir desta concentração foi construída a curva de calibração externa variando suas concentrações de 0,5 a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$. O padrão interno foi mantido constante em todos os pontos da curva na concentração fixa de $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Cada ponto foi diluído com 50% (v/v) de etanol grau HPLC. A relação das áreas do analito/padrão interno *versus* a concentração de cada analito foi avaliada conforme mostra a Figura 9.

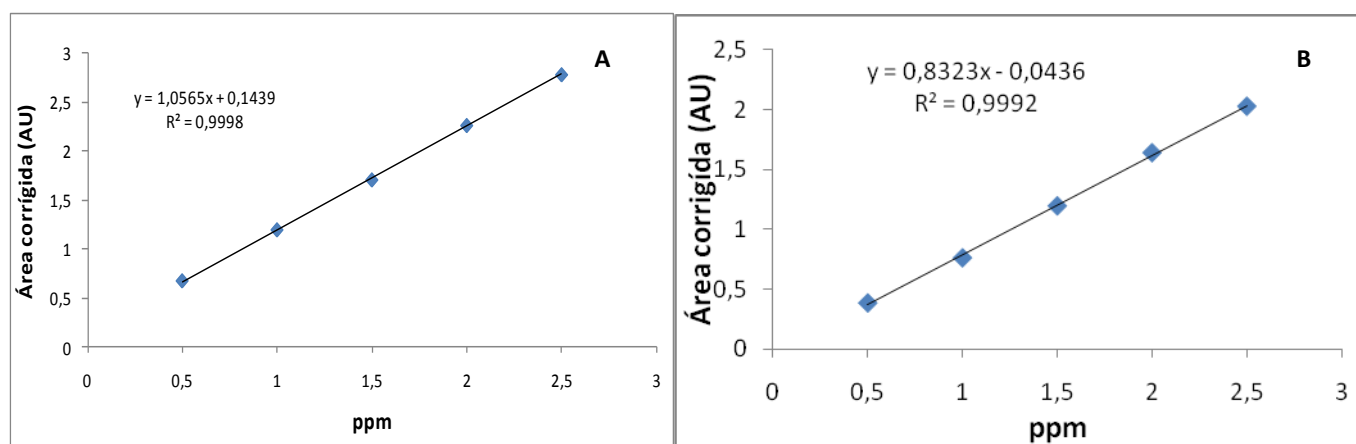


Figura 9: Resultado da curva de calibração externa para os ânions cloreto e sulfato. Legenda: **A.** Curva de calibração externa para o cloreto **B.** Curva de calibração externa para o sulfato.

Cada ponto foi preparado em duplicata e analisado em triplicata. Os resultados obtidos foram satisfatórios tanto para o cloreto ($R^2 = 0,9998$) quanto para o sulfato ($R^2 = 0,9992$), o que demonstra a validade do método obtido. O intervalo de linearidade do método permitiu a quantificação da amostra entre $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ para cloreto e sulfato. O limite estabelecido pela ANP para sulfato é até 4 mg L^{-1} . As amostras analisadas apresentaram-se bem abaixo do limite estabelecido.

Na Tabela 2 são mostrados alguns parâmetros de mérito das curvas para os ânions cloreto e sulfato.

Tabela 2: Parâmetros da curva de calibração.

Analito	a^a	b^a	R^2	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
Cloreto	1,0565	0,1439	0,9998	0,04	0,12
Sulfato	0,8323	0,0436	0,9992	0,08	0,27

^a $y=ax+b$

Os limites de detecção e quantificação podem ser calculados de três maneiras diferentes, através do método visual, relação sinal-ruído e avaliação de parâmetros da curva de calibração [26]. Portanto, a partir de dados obtidos da curva de calibração obteve-se um limite de detecção do método de $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ para cloreto e $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ para sulfato que é 3,3 vezes o desvio padrão do intercepto pelo coeficiente angular da curva, sendo esta a concentração mínima detectada pelo método. Este valor se refere à quantidade mínima analisada após as diluições necessárias para o preparo da amostra, que equivale a duas vezes, ou seja, a concentração mínima detectada na amostra é duas vezes este valor, ou $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,16 \text{ mg kg}^{-1}$. O limite de quantificação que é 10 vezes o desvio padrão do intercepto pelo coeficiente angular da curva encontrado para o cloreto foi de $0,12 \text{ mg kg}^{-1}$ e para o sulfato foi de $0,27 \text{ mg kg}^{-1}$, então fazendo o mesmo raciocínio para o tratamento na amostra, encontra-se um valor mínimo de quantificação de $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ para cloreto e $0,54 \text{ mg L}^{-1}$ para sulfato.

Os ensaios de recuperação para a determinação da exatidão e precisão do método foi realizado pela construção de curvas de calibração externa por adição de padrão sobre a “amostra 2” de álcool combustível, a qual foi fortificada com padrões de cloreto e sulfato em cinco níveis de concentrações ($0,5$; $1,0$; $1,5$; $2,0$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e posterior adição de padrão interno. Os resultados das recuperações encontram-se na Tabela 3 para cloreto e na Tabela 4 para o sulfato.

Tabela 3: Ensaios de recuperação para cloreto.

Ânion	Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Cloreto	0,5	0,56 ± 0,02	112,07 ± 2,19
	1,0	0,93 ± 0,01	92,62 ± 0,97
	1,5	1,68 ± 0,02	111,86 ± 1,08
	2,0	1,89 ± 0,05	94,74 ± 1,85
	2,5	2,31 ± 0,04	92,59 ± 1,25
Média			100,92 ± 10,25

Tabela 4: Ensaios de recuperação para sulfato.

Ânion	Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Sulfato	0,5	0,55 ± 0,01	108,94 ± 2,49
	1,0	1,03 ± 0,01	103,50 ± 0,41
	1,5	1,51 ± 0,01	100,75 ± 0,49
	2,0	1,99 ± 0,01	100,35 ± 0,34
	2,5	2,47 ± 0,01	99,45 ± 0,60
Média			102,60 ± 3,85

As recuperações variaram entre 92,59 – 112,07 % para o cloreto; 99,45 – 108,94 % para o sulfato. Os ensaios de recuperação mostraram-se satisfatórios, mas com uma menor precisão para o cloreto. Já para a determinação de sulfato, o método mostrou-se mais exato e com boa precisão quando comparado ao cloreto.

Os ensaios de precisão do método foram realizados através da avaliação quanto a sua repetitividade, precisão instrumental e precisão inter e intra-ensaio. Em todos os casos foram avaliados quanto aos valores da área do analito corrigida, do tempo de migração e do tempo corrigido (tempo de migração do analito em relação ao tempo de migração do padrão interno). Todos estes valores encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

A precisão instrumental foi avaliada através de seis análises consecutivas de uma mesma amostra de padrão. O coeficiente de variação encontrado foi menor que 3,89% para cloreto e 2,43% para sulfato. Para a precisão intra-ensaio foram preparadas duas vezes a mesma solução de padrões na concentração de 1,5 mg L⁻¹ e cada uma foi injetada em duplicata. Os valores encontrados de CV% foram menores que 1,81% e 2,37% para cloreto e sulfato, respectivamente.

Na precisão inter ensaio foi avaliada a repetibilidade do método em três diferentes dias com a preparação de três vezes a mesma solução de padrões na concentração de 1,5 mg L⁻¹ e analisada em triplicata. Uma vez que o CV% para a área do pico corrigida foi da ordem de 10% tanto para cloreto como para sulfato, é evidente a necessidade da construção diária de curva de calibração externa.

Todas as figuras de mérito encontram-se na Tabela 5 para cloreto e na Tabela 6 para o sulfato.

Tabela 5: Figuras de mérito do método proposto para o cloreto.

Parâmetros				Valor
Resolução (cloreto, perclorato); (sulfato, perclorato)	Analito	Pico adjacente		1,6571
Precisão instrumental (RSD %); área de pico	n =	6		3,8991
Precisão instrumental (RSD %); tempo de migração	n =	6		0,6212
Precisão instrumental (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	6		0,3074
Precisão intra ensaio (RSD %); área de pico	n =	4		2,7276
Precisão intra ensaio (RSD %); tempo de migração	n =	4		1,9236
Precisão intra ensaio (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	4		0,1486
Precisão inter ensaio (RSD %); área de pico	n =	9		9,4974
Precisão inter ensaio (RSD %); tempo de migração	n =	9		3,5378
Precisão inter ensaio (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	9		2,9632
Linearidade – inclinação				1,056472
Desvio Padrão da Inclinação				0,007906
Linearidade – intercepto				0,143931
Desvio Padrão do Intercepto				0,01311
Linearidade - coeficiente de correlação				0,999832
F				17858,22
Precisão (% recuperação);	Add	0,5	mg/kg	112,8
Precisão (% recuperação);	Add	1	mg/kg	92,6
Precisão (% recuperação);	Add	1,5	mg/kg	111,9
Precisão (% recuperação);	Add	2	mg/kg	94,7
Precisão (% recuperação);	Add	2,5	mg/kg	92,6
LOQ (mg kg ⁻¹)*				0,12
LOD (mg kg ⁻¹)*				0,04
*Curva analítica				

Tabela 6: Figuras de mérito do método proposto para o sulfato.

Parâmetros				Valor
Resolução (cloreto, perclorato); (sulfato, perclorato)	Analito	Pico adjacente		1,2614
Precisão instrumental (RSD %); área de pico	n =	6		2,4354
Precisão instrumental (RSD %); tempo de migração	n =	6		0,5969
Precisão instrumental (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	6		0,1199
Precisão intra ensaio (RSD %); área de pico	n =	4		2,3714
Precisão intra ensaio (RSD %); tempo de migração	n =	4		0,6328
Precisão intra ensaio (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	4		0,0490
Precisão inter ensaio (RSD %); área de pico	n =	9		7,5074
Precisão inter ensaio (RSD %); tempo de migração	n =	9		0,6038
Precisão inter ensaio (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	9		0,0888
Linearidade – inclinação				0,832318
Desvio Padrão da Inclinação				0,013337
Linearidade – intercepto				-0,04358
Desvio Padrão do Intercepto				0,022117
Linearidade - coeficiente de correlação				0,99923
F				3894,528
Precisão (% recuperação);	Add	0,5	mg/ kg	111,0
Precisão (% recuperação);	Add	1	mg/ kg	103,1
Precisão (% recuperação);	Add	1,5	mg/ kg	101,1
Precisão (% recuperação);	Add	2	mg/ kg	100,0
Precisão (% recuperação);	Add	2,5	mg/ kg	98,9
LOQ (mg kg ⁻¹)*				0,27
LOD (mg kg ⁻¹)*				0,08
*Curva analítica				

5.5 Determinações de cloreto e sulfato a partir de curva de calibração interna universal:

Uma vez que o co-íon e o padrão interno apresentam mobilidades próximas a dos analitos estudados, utilizou-se a calibração interna universal como uma forma de facilitar as análises, por não haver a necessidade de construção de curvas, e portanto, em apenas uma única injeção a quantificação é realizada. Cada amostra recebeu apenas o tratamento de diluição de 1:1 (v/v) com solução de PI, e foram levadas para análise no equipamento de eletroforese capilar.

Para a quantificação de cada analito na amostra, usamos a Equação 2, onde o TR_{IUS} [$TR_{IUS} = (\mu_B/\mu_{IUS})(\mu_{IUS} - \mu_{count})/(\mu_{count} - \mu_B)$] praticamente não depende da força iônica, pois tanto o co-íon do eletrólito como o padrão interno estão completamente dissociados na forma de espécies monovalentes com mobilidades próximas.

O TR_x é sofre maior influência da força iônica [$TR_x = (\mu_B/\mu_x)(\mu_x - \mu_{count})/(\mu_{count} - \mu_B)$] por causa das espécies divalentes. Mas como esta mudança da força iônica influencia tanto o numerador como o denominador (TR_{IUS}/TR_x) o seu efeito será semelhante, podendo então ser desconsiderado.

As mobilidades efetivas de cada analito foram retiradas do “software” Peakmaster 5.1 e o valor de TR_{IUS}/TR_x para cada analito foi calculado e encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7: Efeito da mobilidade, valores de TR_{IUS}/TR_x

Analitos	$\mu_{eff} (10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$	TR_{IUS}/TR_x
Cloreto	-74,732	1,020
Sulfato	-72,165	1,015
Perclorato (PI)	-65,738	
Nitrato (co-íon)	-69,899	
TRIS (contra-íon)	+13,098	

5.6 Comparação entre curvas de Calibração Externa e Calibração Interna Universal:

As Figuras 10 e 11 mostram a comparação das duas estratégias para determinação da concentração de cloreto e sulfato.

Na Figura 10, percebeu-se que para concentrações menores de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cloreto, há um desvio considerável devido às baixas concentrações encontradas do analito na amostra e também por trabalharmos com uma contaminação de cloreto, pela sua facilidade de estar presente em vidrarias, água, eletrodos e até na mão, interferindo nas análises realizadas para concentrações muito baixas. Tentou-se eliminá-la com a lavagem exaustiva das vidrarias com enxágüe utilizando água desionizada, limpeza diária dos eletrodos e uso de luvas, mas não se obteve sucesso com completa eliminação.

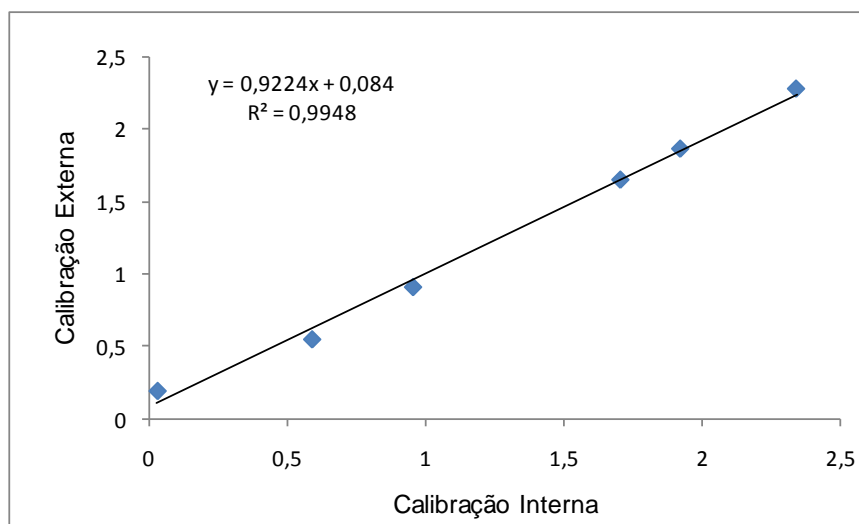


Figura 10: Comparações entre as curvas de calibração externa e calibração interna para adições de padrão de cloreto na “amostra 2”.

A correlação para o sulfato com os dois métodos de calibração foi considerada excelente, conforme mostra a Figura 11.

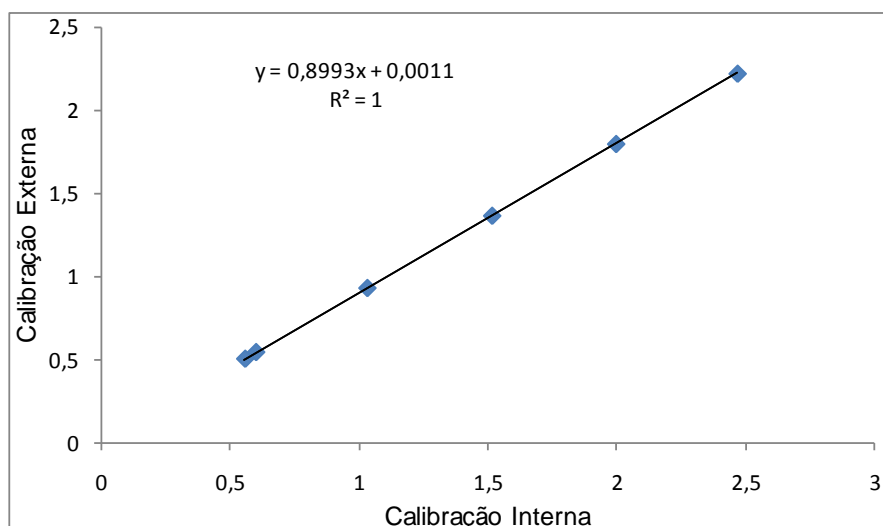


Figura 11: Comparações entre a curva de calibração externa e calibração interna para adições de padrão de sulfato na “amostra 2”.

5.7 Aplicação do método:

Aplicando a Equação 2 para as seis amostras de combustíveis foi possível encontrar as concentrações que cada amostra possui de sulfato e cloreto, conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Quantificação para cloreto e sulfato das amostras de combustíveis.

Amostra	Cloreto (mg/L)	Sulfato (mg/L)
1	0,34 ± 0,08	1,16 ± 0,04
2	0,29 ± 0,07	1,13 ± 0,04
3	0,24 ± 0,06	0,80 ± 0,03
4	0,19 ± 0,05	1,15 ± 0,05
5	0,25 ± 0,06	1,13 ± 0,04
6	0,22 ± 0,05	1,18 ± 0,05

Concluimos que todas as amostras estão bem abaixo do limite imposto pela ANP tanto para cloreto como para sulfato.

A Figura 12 mostra o perfil eletroforético de três amostras diferentes de combustível com o método otimizado.

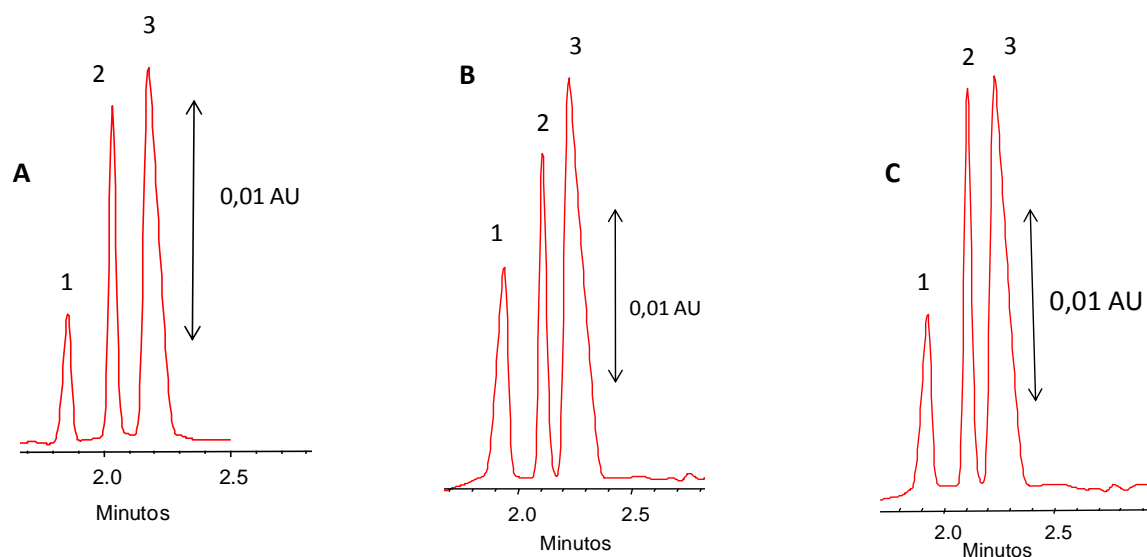


Figura 12: Diferentes amostras de combustíveis. **A.** Amostra 1 **B.** Amostra 3 e **C.** Amostra 6. Legenda: 1. Cloreto 2. Perclorato 3. Sulfato. Eletrólito constituído por 10 mmol L⁻¹ HNO₃, 20 mmol L⁻¹ TRIS e 1 mmol L⁻¹ Hexa-OH pH = 8,13. Parâmetros instrumentais: injeção eletrocinética (8 kV, 10 s); tensão aplicada - 30 kV; 25°C; detecção indireta em 214 nm.

6. Conclusões:

Pode-se concluir que a eletroforese capilar pode ser utilizada com eficiência como método alternativo aos métodos já propostos na literatura e até mesmo alternativos ao método oficial estabelecido pela ANP para quantificação do cloreto e sulfato em amostras de álcool combustível e, portanto ser usado em determinações destes ânions em outras matrizes. Além do que, a eletroforese capilar apresenta um grande potencial como método analítico, por ser rápido, com baixo consumo de amostras e reagentes.

As figuras de mérito para a curva de calibração externa, apresentaram excelente linearidade com coeficientes de correlação maiores que 0,999 tanto para cloreto como para sulfato, exatidão próxima a 100% para cloreto e 102% para sulfato e precisão intra-ensaio e instrumental menores que 3,89. Sendo necessária a construção da curva diariamente devido à precisão inter-ensaio ser de 9,5% para cloreto.

O método de preparação da amostra é uma das grandes vantagens do método proposto pela simplicidade e facilidade de preparo. Além da vantagem do uso da calibração interna universal como maneira de quantificar as amostras, tornando-o muito mais rápido e prático.

6.1 Perspectivas:

Validar o método desenvolvido neste trabalho de conclusão de curso com a comparação com o método oficial utilizado pela ANP o NBR10894 por cromatografia iônica.

7. Referências Bibliográficas

1. SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R.; Produção de Bioetanol de Bagaço de Cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 2009, 11, 27-33.
2. GOLDEMBERG, J.; MOREIRA, J.R.; The Alcohol Program. **Energy Policy**. 1999, 27, 229-245.
3. <http://www.biodieselbr.com> acessado em Setembro de 2009.
4. www.etanolverde.com.br acessado em 07 de maio de 2010.
5. ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L. A.; Towards ProAlcool II — a review of the Brazilian Bioethanol Programme. **Biomass and Bioenergy**. 1998, 14, 115-124.
6. <http://www.anp.gov.br> acessado em Setembro de 2009.
7. AVELAR, H. M.; BARBEIRA P. J.; Determinação Potenciométrica de Agentes Corrosivos em Álcool Combustível. **Analytica**. 2005, 16, 38-43.
8. MONTEIRO, M. C.; AMBROZIN, A. R. P.; KURI, S. E.; Corrosão Metálica Associada ao uso de Combustíveis Minerais e Biocombustíveis. **Química Nova**. 2009, 7, 1910-1916.
9. SKOOG, D. A.; **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira, 2006. 999.
10. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/tiselius-bio.html acessado em 12 de junho de 2010.
11. LEWIS, S. W.; ANASTOS, N.; BARNETT, N. W.; Capillary Electrophoresis for Forensic Drug Analysis: A review. **Talanta**. 2005, 67, 269-279.
12. SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T.; TAVARES, M. F. M.; Terminologia para as Técnicas Analíticas de Eletromigração em Capilares. **Química Nova**. 2007, 30, 740-744.
13. TAVARES, M. F. M.; Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**. 1996, 09, 173-181.
14. COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S.; Determinação Simultânea de Ânions por Eletroforese Capilar: Características e Aplicações. **Química Nova**. 1997, 20, 512-518.

15. FUNG, Y.; LAU, K.; Development and Validation of Analytical Methodology using Capillary Electrophoresis for Separation and Determination of Anions in Rainwater. **Talanta**. 1998, 45, 641-656.
16. GASPAR, A.; DUDÁS, E.; Application of Internal Universal Calibration for Determination of Fully Dissociated Species in Capillary Electrophoresis using Indirect UV Detection and Electrokinetic Injection. **Journal of Chromatography A**. 2006, 1110, 254-260.
17. HADDAD, P. R.; HARAKUWE, A. H.; Control of Separation Selectivity in Capillary Zone Electrophoresis of Inorganic Anions. **Journal of Chromatography A**. 1999, 834, 213-232.
18. TEIXEIRA, L. S. G.; CHAVES, T. J.; GUIMARÃES, P. R. B.; PONTES, L. A. M.; TEIXEIRA J. S. R.; Indirect Determination of Chloride and Sulfate Ions in Ethanol Fuel by X-ray Fluorescence after a Precipitation Procedure. **Analytica Chimica Acta**. 2009, 640, 29-32.
19. OLIVEIRA, F. S.; KORN, M.; Spectrophotometric Determination of Sulphate in Automotive Fuel Ethanol by Sequential Injection Analysis using Dimethylsulphonazo(III) Reaction. **Talanta**. 2006, 68, 992-999.
20. MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; DE JESUS, D. P.; DO LAGO, C. L.; ANGNES, L.; Determination of Inorganic Ions in Ethanol Fuel by Capillary Electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 2004, 15, 523-526.
21. PEREIRA, E. A.; STEVANATO, A.; CARDOSO, A. A.; TAVARES, M. F. M.; Indirect Determination of Chloride and Sulfate Ions in Alcohol Fuel by Capillary Electrophoresis. **Anal. Bioanal. Chem.** 2004, 380, 178.
22. BOCEK, P.; DEML, M.; GEBAUER, P.; DOLNÍK, V.; RADOLA, B.J.; **Analytical Isotachophoresis**, first ed., New York, VCH, 1988.
23. LUCY, C. A.; DIRESS, A. G.; Study of the Selectivity of Inorganic Anions in Hydro-Organic Solvents Using Indirect Capillary Electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. 2005, 1085, 155-163.
24. VARENNE, A.; DESCROIX, S.; ADAMO, C.; GAREIL, P.; Capillary Electrophoresis of Inorganic Anions in Hydro-Organic Media Influence of Ion-Pairing and Solvation Phenomena. **Journal of Chromatography A**. 2004, 1032, 149-158.
25. FRIEDL, W.; REIJENGA, J. C.; KENNDLER, E.; Ionic Strength and Charge Number Correction for Mobilities of Multivalent Organic Anions in Capillary Electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. 1995, 709, 163-170.

26. JARDIM, I. C. S. F.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; RIBANI, M.; MELO, L. F. C.; Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**. 2004, 27, 771-780.